

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

J1017 U.S. PTO  
10/087633  
03/01/02

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 9月 3日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第249959号

出 願 人

Applicant (s):

三共株式会社

2000年 9月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3073977

【書類名】 特許願

【整理番号】 99129SK

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 1/02

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株式会社内

    【氏名】 犬飼 正俊

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株式会社内

    【氏名】 高津 敏夫

【発明者】

    【住所又は居所】 東京都品川区広町 1 丁目 2 番 5 8 号 三共株式会社内

    【氏名】 矢野 辰也

【発明者】

    【住所又は居所】 茨城県つくば市御幸が丘 3 3 三共株式会社内

    【氏名】 田中 一新

【特許出願人】

    【識別番号】 000001856

    【氏名又は名称】 三共株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100081400

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 大野 彰夫

【選任した代理人】

    【識別番号】 100092716

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 中田 ▲やす▼雄

【選任した代理人】

    【識別番号】 100096666

【弁理士】

【氏名又は名称】 室伏 良信

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010216

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9704937

【包括委任状番号】 9704935

【包括委任状番号】 9704936

【ブルーフの要否】 要

【書類名】明細書

【発明の名称】新規化合物 F - 1 5 0 7 8

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記の理化学的性状を有する F-15078 またはその塩：

(1) 物質の性状：塩基性脂溶性粉末

(2) 紫外線吸収スペクトル：末端吸収

(3)  $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル：( $\delta$ , ppm)

重クロロホルム中、テトラメチルシランを内部標準として測定した核磁気共鳴スペクトル (500 MHz) は、次に示す通りである。

0.78(3H), 0.79(3H), 0.80(3H), 0.82(3H), 0.87(3H), 0.92(3H), 0.93(3H), 0.94(3H), 0.96(3H), 0.97(3H), 0.98(3H), 1.01(3H), 1.02(3H), 1.03(3H), 1.06(3H), 1.21(1H), 1.41(3H), 1.41(2H), 1.48(1H), 1.48(1H), 1.49(1H), 1.52(3H), 1.55(1H), 1.65(1H), 1.66(1H), 1.70(2H), 1.73(1H), 1.81(1H), 1.87(1H), 2.28(1H), 2.31(1H), 2.37(1H), 2.48(3H), 2.89(3H), 2.94(3H), 2.96(1H), 3.29(3H), 3.56(1H), 4.06(1H), 4.14(1H), 4.77(1H), 4.78(1H), 4.84(1H), 4.91(1H), 4.96(1H), 5.21(1H), 5.25(1H), 5.53(1H), 6.39(1H), 7.83(1H), 7.94(1H), 8.28(1H)

(4)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル：( $\delta$ , ppm)

重クロロホルム中、テトラメチルシランを内部標準として測定した核磁気共鳴スペクトル (500 MHz) は、次に示す通りである。

10.9(q), 11.9(q), 15.0(q), 15.1(q), 16.0(q), 16.6(q), 17.4(q), 18.3(q), 18.6(q), 18.7(q), 19.1(q), 21.0(q), 21.4(q), 22.1(q), 23.1(q), 23.51(q), 23.54(q), 24.2(t), 24.6(d), 24.8(d), 25.4(d), 25.5(t), 27.7(d), 29.5(q), 29.8(d), 30.2(q), 36.1(q), 36.5(t), 37.7(t), 38.3(d), 38.4(d), 39.7(t), 40.9(q), 46.2(d), 51.8(d), 53.1(d), 54.7(d), 55.1(d), 63.9(d), 64.7(d), 68.1(d), 70.1(d), 73.4(d), 74.3(d), 77.1(d), 169.03(s), 169.04(s), 169.6(s), 169.8(s), 169.9(s), 170.3(s), 172.0(s), 173.4(s), 173.8(s), 174.0(s)

(5) 高速液体クロマトグラフィー：

分離カラム：Shodex Asahipak C8P 50 4E (昭和電工 (株) 社製)

移動層：アセトニトリル：10 mM炭酸水素アンモニウム水 = 13：7

流速：0.7 ml / 分

検出波長：UV 210 nm

保持時間：10.20分

(6) 溶解性：ジメチルスルホキシド (以下「DMSO」という。)、メタノール、クロロホルムに可溶。

(7) アミノ酸分析：加水分解物としてスレオニン、アラニン、イソロイシンが認められた。

【請求項 2】

ホーマ (Phoma) 属に属する F-15078 生産菌を培養し、その培養物より F-15078 を採取することを特徴とする F-15078 の製造方法。

【請求項 3】

ホーマ (Phoma) 属に属する F-15078 生産菌がホーマ・エスピー (Phoma sp.) SANK 13899 株 (FERMBP-6851) である請求項 2 に記載の製造方法。

【請求項 4】

F-15078 またはその薬理上許容される塩からなる医薬。

【請求項 5】

F-15078 またはその薬理上許容される塩を有効成分とする真菌感染症の予防薬または治療薬。

【請求項 6】

ホーマ・エスピー (Phoma sp.) SANK 13899 株 (FERMBP-6851)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は抗真菌剤として有用な F-15078 またはその塩に関する。

【0002】

【従来の技術】

従来、抗真菌活性を有するペプチド系の化合物としては、ザレリオン(Zalerion)属等が生産するニューモカンジン(pneumocandin)類 (J. Antibiotics 45, 1886-1891(1992))、アスペルギルス (Aspergillus)属等が生産するエキノカンジン(echinocandin)類 (Helv. Chim. Acta 57, 2459-2477(1974))、又、オーレオバシジウム(Aureobasidium)属が生産するオーレオバシジン(aureobasidin)類 (J. Antibiotics 44, 919-924(1991)) が報告されている。

【0 0 0 3】

現在まで小房子のう菌のホーマ属が、ペプチド系の抗真菌物質を生産するという報告はない。

【0 0 0 4】

【発明が解決しようとする課題】

本発明者らは、東京都小笠原村父島において採集した土壌より採取されたホーマ・エスピー (Phoma sp.) F-15078株より、新規抗真菌物質 F-15078を単離・精製し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、

(1)

下記の理化学的性状を有するF-15078またはその塩：

- (1) 物質の性状：塩基性脂溶性粉末、
- (2) 紫外線吸収スペクトル：末端吸収、
- (3)  $^1\text{H}$ -核磁気共鳴スペクトル： $(\delta, \text{ppm})$ 、

重クロロホルム中、テトラメチルシランを内部標準として測定した核磁気共鳴スペクトル(500 MHz)は、次に示す通りである、

0.78(3H), 0.79(3H), 0.80(3H), 0.82(3H), 0.87(3H), 0.92(3H), 0.93(3H), 0.94(3H), 0.96(3H), 0.97(3H), 0.98(3H), 1.01(3H), 1.02(3H), 1.03(3H), 1.06(3H), 1.21(1H), 1.41(3H), 1.41(2H), 1.48(1H), 1.48(1H), 1.49(1H), 1.52(3H), 1.55(1H), 1.65(1H), 1.66(1H), 1.70(2H), 1.73(1H), 1.81(1H), 1.87(1H), 2.28(1H), 2.31(1H), 2.37(1H), 2.48(3H), 2.89(3H), 2.94(3H), 2.96(1H), 3.29(3H), 3.56(1H), 4.06(1H), 4.14(1H), 4.77(1H), 4.78(1H), 4.84(1H), 4.

91(1H), 4.96(1H), 5.21(1H), 5.25(1H), 5.53(1H), 6.39(1H), 7.83(1H), 7.94(1H), 8.28(1H)

(4)  $^{13}\text{C}$ -核磁気共鳴スペクトル: ( $\delta$ , ppm)

重クロロホルム中、テトラメチルシランを内部標準として測定した核磁気共鳴スペクトル(500 MHz)は、次に示す通りである、

10.9(q), 11.9(q), 15.0(q), 15.1(q), 16.0(q), 16.6(q), 17.4(q), 18.3(q), 18.6(q), 18.7(q), 19.1(q), 21.0(q), 21.4(q), 22.1(q), 23.1(q), 23.51(q), 23.54(q), 24.2(t), 24.6(d), 24.8(d), 25.4(d), 25.5(t), 27.7(d), 29.5(q), 29.8(d), 30.2(q), 36.1(q), 36.5(t), 37.7(t), 38.3(d), 38.4(d), 39.7(t), 40.9(q), 46.2(d), 51.8(d), 53.1(d), 54.7(d), 55.1(d), 63.9(d), 64.7(d), 68.1(d), 70.1(d), 73.4(d), 74.3(d), 77.1(d), 169.03(s), 169.04(s), 169.6(s), 169.8(s), 169.9(s), 170.3(s), 172.0(s), 173.4(s), 173.8(s), 174.0(s)

(5) 高速液体クロマトグラフィー:

分離カラム: Shodex Asahipak C8P 50 4E (昭和電工 (株) 社製)

移動層 : アセトニトリル:10 mM炭酸水素アンモニウム水 = 13 : 7

流速 : 0.7 ml / 分

検出波長: UV 210 nm

保持時間: 10.20分

(6) 溶解性: ジメチルスルホキシド (以下「DMSO」という。)、メタノール、クロロホルムに可溶、

(7) アミノ酸分析: 加水分解物としてスレオニン、アラニン、イソロイシンが認められた、

(2)

ホーマ(Phoma)属に属するF-15078生産菌を培養し、その培養物よりF-15078を採取することを特徴とするF-15078の製造方法、

(3)

ホーマ(Phoma)属に属するF-15078生産菌がホーマ・エスピー(Phoma sp.) SANK 13899株(F E R M B P - 6 8 5 1)である (2) に記載の製造方法、

(4)

F-15078またはその薬理上許容される塩からなる医薬、

(5)

F-15078またはその薬理上許容される塩を有効成分とする真菌感染症の予防薬または治療薬、

(6)

ホーマ・エスピー(Phoma sp.) SANK 13899株(F E R M B P - 6 8 5 1)、  
に関する。

【0005】

本発明のF-15078は、常法に従って塩にすることができる。F-15078の塩としては、医学的に使用され、薬理上受け入れられるものであれば特に限定はない。なお、医薬品以外の用途、例えば中間体として使用する場合はなんら限定はない。その様な塩としては、好適には酢酸塩、臭化物塩、塩化物塩、塩酸塩、臭酸塩、ヨウ化物塩、硫酸塩、リン酸塩、ニリン酸塩のような無機塩；クエン酸塩、マレイン酸塩、パモ酸塩、酒石酸塩のような有機酸塩等を挙げることができる。薬理上許容される塩としては好適には塩酸塩のような無機塩、パモ酸塩のような有機酸塩である。

【0006】

更に、本発明のF-15078は種々の立体構造を有する。本発明においては、これらの特異性の等量および非等量混合物がすべて単一の式で示されている。従って、本発明においてはこれらの異性体およびこれらの異性体の混合物をもすべて含むものである。

【0007】

更に本発明において、F-15078が溶剤和物（例えば水和物）を形成する場合には、これらもすべて含むものである。

【0008】

例えば、本発明のF-15078が、大気中に放置されたり、または再結晶をすることにより、水分を吸収し、吸着水が付着したり、水和物を形成する場合がある。本発明にはこのような溶剤和物も含まれる。



【 0 0 0 9 】

更に本発明において、生体内において代謝されてF-15078に変換される化合物、いわゆるプロドラッグもすべて含むものである。

【 0 0 1 0 】

【発明の実施の形態】

### 生産菌

本発明のF-15078の製造方法において用いられるホーマ (Phoma) 属に属する菌株としては、たとえばホーマ・エスピー (Phoma sp.) F-15078株をあげることができる。F-15078株は、東京都小笠原村父島において採集した土壌より得られたものである。本菌の菌学的性状を観察するため、次の各培地上で培養を行った。使用した各培地の組成を以下に記す。

### PDA培地 {ポテトデキストロース寒天 (Potato Dextrose Agar) 培地}

ニッスイ ポテトデキストロース寒天培地

(日水製薬 (株) 製) 39 g

蒸留水 1000 ml

### CMA培地 {コーンミール寒天 (Corn Meal Agar) 培地}

コーンミールアガール

(日水製薬 (株) 製) 17 g

蒸留水 1000 ml

### WSH培地

クエーカーオートミール 10 g

硫酸マグネシウム7水和物 1 g

リン酸2水素カリウム 1 g

硝酸ナトリウム 1 g

寒天 20 g

蒸留水 1000 ml

三浦培地

グルコース	1 g
リン酸2水素カリウム	1 g
硫酸マグネシウム7水和物	0.2 g
塩化カリウム	0.2 g
イーストエキス	0.2 g
硝酸ナトリウム	2 g
寒天	20 g
蒸留水	1000 ml

CYA培地 {ザベックイーストエキシアガー (Czapek Yeast Extract Agar) 培地}

リン酸水素2カリウム	1.0 g
ザベック濃縮液	10 ml
イーストエキス	5 g
シュクロース	30 g
寒天	15 g
蒸留水	1000 ml

MEA培地 {モルトエキシアガー (Malt Extract Agar) 培地}

モルトエキス	20 g
ペプトン	1 g
グルコース	20 g
寒天	20 g
蒸留水	1000 ml

G 2 5 N培地 {25%グリセロール硝酸 (25% Glycerol Nitrate Agar) 培地}

リン酸水素2カリウム	0.75 g
------------	--------

ザベック濃縮液	7.5	ml
イーストエキス	3.7	g
グリセロール	250	g
寒天	12	g
蒸留水	750	ml

上記において、ザベック濃縮液とは、以下の組成の溶液を示す。

【0 0 1 1】

硝酸ナトリウム	30	g
塩化カリウム	5	g
硫酸マグネシウム7水和物	5	g
硫酸鉄(II)7水和物	0.1	g
硫酸亜鉛7水和物	0.1	g
硫酸銅5水和物	0.05	g
蒸留水	100	ml

色調の表示は「メチューン・ハンドブック・オブ・カラー」(Kornerup, A. and Wanscher, J. H. (1978) Methuen handbook of colour(3rd. edition). Erye M thuen, London.)に従った。

【0 0 1 2】

F-15078株の培養下での菌学的性状は次の通りである。

【0 0 1 3】

PDA培地上での成長は、23℃、2週間の培養で直径13乃至17 mmである。コロニーは綿毛状、中央部で羊毛状に隆起し、コロニーの縁辺部はやや歯状である。コロニー表面は、グレー(3B1)乃至白色である。裏面はブラウン(6E5乃至4)である。

【0 0 1 4】

CMA培地上での成長は、23℃、2週間の培養で直径15乃至17 mmである。コロニーは粉状で、コロニーの縁辺部は歯状である。コロニー表面はグレイッシュグ

リーン (27E5) 乃至ダルグリーン (27E4) である。裏面はダークグリーン (27F4) である。

【0015】

三浦培地上での成長は、23℃、2週間の培養で直径22乃至33 mmである。コロニーは圧伏し、コロニーの縁辺部は全縁である。コロニー表面は白色である。裏面はイエローイッシュホワイト (3A2) 乃至白色である。

【0016】

WSH培地上での成長は、23℃、2週間の培養で直径33乃至34 mmである。コロニーは圧伏し、コロニーの縁辺部は全縁である。コロニー表面はパールイエロー (3A3) 乃至イエローイッシュホワイト (3A2) である。裏面はコロニー表面と同色である。

【0017】

CYA培地上での成長は、23℃、2週間の培養で直径34乃至35 mmである。コロニーは綿毛状であり、中央部で羊毛状に隆起し、弱い可溶性色素を分泌する。コロニーの縁辺部は圧伏し、全縁である。コロニー表面はグレーイッシュオレンジ (6B3) である。裏面はブラウニッシュオレンジ (6C8) 乃至ブラウン (6D8) である。

【0018】

MEA培地上での成長は、23℃、2週間の培養で直径15乃至23 mmである。コロニーは綿毛状、中央部で羊毛状に隆起する。コロニーの縁辺部は圧伏し、全縁乃至やや歯状である。コロニー表面は白色乃至グレー (3B1) である。裏面はダークグリーン (28F4乃至3) である。

【0019】

G25N培地上では生育しない。

【0020】

菌糸は直径0.5乃至3 μmであり、しばしば束状になり、薄壁乃至厚壁で、滑面乃至粗面で、無色乃至褐色である。

【0021】

F-15078株は、PDA培地や三浦培地などで1月間以上培養を継続することにより、セクターを形成し、その部分の寒天培地内に埋没した分生子殻を形成した。そ

の菌学的性状は次の通りである。

【 0 0 2 2 】

分生子殻は直径100乃至200  $\mu\text{m}$ 、寒天培地にすべて埋没乃至一部埋没し、球形乃至亜球形で褐色乃至黒色である。開口部は観察されなかった。分生子形成細胞は $7.5-9 \times 1.3-1.8 \mu\text{m}$ で、球形の分生子殻内層細胞の上に形成され、単細胞で円筒形乃至ペン先形であり、無色である。フィアロ型分生子は $3.5-4.7 \times 1.3-1.8 \mu\text{m}$ で、円筒形、単細胞で無色である。菌糸は直径0.5乃至3  $\mu\text{m}$ で、しばしば束状になり、薄壁乃至厚壁で、滑面乃至粗面であり、無色乃至褐色である。本菌を小林の文献（小林享夫：Phyllosticta属・Phoma属およびMacrophoma属（2）. J. Antibact. Antifung. Agents 22, 757-763(1994)）などを参考にホーマ・エスピー（Phoma sp.）と同定し、SANK 13899を付与した。

【 0 0 2 3 】

尚、F-15078株は、ホーマ・エスピー SANK 13899株として、平成11年8月20日に通商産業省工業技術院生命工学技術研究所に寄託され、受託番号 F E R M B P - 6 8 5 1 が付された。

【 0 0 2 4 】

周知の通り、真菌類は自然界において、または人工的な操作（例えば、紫外線照射、放射線照射、化学薬品処理等）により、変異を起こしやすく、本発明のホーマ・エスピー SANK 13899株（以下SANK 13899株と略記する）もその点は同じである。本発明にいうSANK 13899株はその全ての変異株を包含する。また、これらの変異株の中には、遺伝的方法、たとえば組み換え、形質導入、形質転換等によりえられたものも包含される。即ち、F-15078を生産するSANK 13899株、それらの変異株およびそれらと明確に区別されない菌株は全てSANK 13899株に包含される。

### 培養法及び精製法

本発明のF-15078を得るため、これらの微生物の培養は一般に他の発酵生成物を生産するために用いられるような培地中で行なわれる。このような培地中には、微生物が資化出来る炭素源、窒素源および無機塩を含有する。

【0025】

一般に、炭素源としてはグルコース、フラクトース、マルトース、シュークロース、マンニトール、グリセリン、デキストリン、オート麦、ライ麦、トウモロコシデンプン、ジャガイモ、トウモロコシ粉、大豆油、綿実油、糖蜜、クエン酸、酒石酸等をあげることができる。これらの炭素源は当該培地に単独で用いてもよいし、同培地にいくつかの炭素源を組み合わせることもできる。

【0026】

培地に用いる炭素源の正確な量は、培地中の他の成分にもよるが、通常、培地量の1-10重量%で変量する。

【0027】

一般に窒素源としては、大豆粉、フスマ、落下生粉、綿実粉、カゼイン加水分解物、ファーマミン、コーンスチープリカー、ペプトン、肉エキス、イースト、イーストエキス、マルトエキス、硝酸ナトリウム、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等である。これらの窒素源は、0.2-6重量%の範囲の量で、単独または組み合わせることもできる。

【0028】

炭素源および窒素源は、一般に組み合わせるが、純粋な形態である必要がなく、微量の生育因子、ビタミンおよび無機栄養を含むより純度の低いものを用いてもよい。また、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、アンモニウム、カルシウム、リン酸、硫酸、塩酸、炭酸等のイオンを得ることの出来る通常の塩類を培地中に加えてもよい。また、菌の資化しうるビタミンB<sub>1</sub>、ビオチンのようなビタミン類、チアミンのような菌体増殖促進物質等も必要に応じて添加してもよい。また、マンガン、モリブデン、その他の金属塩が含まれる。更に必要ならば、特に、栄養培地がかなり泡立つならば、シリコンオイル、ポリアルキレングリコールエーテル、植物油、動物油、界面活性剤のような消泡剤を培地に添加してもよく、特に液体培養に際しては、好適である。

【0029】

ホーマ・エスピー SANK 13899株を培養しF-15078を生産させる際、pH 5.0乃至7.0の範囲の培地で培養を行なうことができる。

【0030】

菌の生育温度は15℃から37℃までであるが、22℃から35℃の範囲が生育に良好であり、更にF-15078の生産には、22℃から26℃が好適である。

【0031】

培養方法としては、特に制限はなく、微生物一般に用いられる培養法であればよく、固形培地を用いた培養法、攪拌培養法、振とう培養法、通気培養法等を使用することができる。好適には、好氣的な液体培養法である攪拌培養法、振とう培養法、または通気培養法であり、更に好適には、振とう培養法である。なお、工業的には、通気攪拌培養法が好適である。

【0032】

小規模な培養においては、23℃で数日間、振とう培養を行なうのが好適である。培養は三角フラスコ中で、1-2段階の種の発育工程により開始させる。種の発育段階の培地には、炭素源、窒素源、微量の生育因子、無機塩類および微量金属類を併用できる。種フラスコは定温インキュベーター中で23℃、7日間振とうするか、または十分に成育するまで振とうする。成育した種は、第二の種培地または生産培地に接種するために用いられる。中間の発育工程を用いる場合には、本質的に同様の方法で成育させ、生産培地に接種するためにそれを部分的にあるいは全てを用いる。接種したフラスコを一定温度で数日間振とうし、本培養を行なう。

【0033】

大量培養の場合には、攪拌および通気装置を付けた適当なジャーファーマンターまたはタンクで行なうのが好ましい。この方法によれば栄養培地をジャーファーマンターまたはタンクの中で作成できる。栄養培地を121℃まで加熱して必要時間滅菌し、冷却後、滅菌培地にあらかじめ成長させてあった種を接種する。培養は23℃で通気攪拌して行なう。この方法は、多量の化合物を得るのに適している。

【0034】

培養の経過に伴って生産されるF-15078の量の経時変化は、高速液体クロマトグラフィーを用いて測定することができる。通常は、144時間から192時間の培養

でF-15078の生産量は最高値に達する。

#### 【0035】

培養終了後、培養液中の液体部分および菌体内に存在するF-15078は、培養終了液の全て、あるいは菌体、その他の固形部分を珪藻土をろ過助剤とするろ過操作または遠心分離によって分別し、得られたろ液または上清および菌体中から、その物理化学的性状を利用し抽出精製することができる。例えば、ろ液または上清中に存在するF-15078は、中性pH条件下で水と混和しない有機溶剤、例えば、酢酸エチル、クロロホルム、塩化エチレン、塩化メチレン、ブタノール等の単独または、それらの組み合わせにより抽出精製することができる。あるいは吸着剤として、例えば活性炭または吸着用樹脂であるアンバーライトXAD-2、XAD-4（登録商標、ローム・アンド・ハース社製）等や、ダイアイオンHP-10、HP-20、CHP-20P、HP-50、セパビーズSP-207（登録商標、三菱化学（株）社製）等が使用される。F-15078を含む液を上記のごとき吸着剤の層を通過させて不純物を吸着させて取り除くか、またはF-15078を吸着させた後、メタノール水、アセトン水、ブタノール水等を用いて溶出させることにより得られる。また菌体内に存在するF-15078は、50-90%の含水アセトンまたは含水メタノールにより抽出し有機溶剤を除去した後、ろ液と同様な抽出精製操作を行なうことにより得られる。培養終了液の全てを用いる場合には、培養終了後に適当量、好ましくは終濃度50%になる様にアセトンまたはメタノールを添加し、F-15078を抽出することができる。抽出終了後、珪藻土をろ過助剤とするろ過操作を行ない、得られた抽出液をろ液と同様な抽出精製操作を行なうことにより以降の精製に用いることができる。

#### 【0036】

このようにして得られたF-15078は、更にTSKゲルトヨパールHW-40F（登録商標、トーソー（株）社製）、セファデックスLH-20（登録商標、アマシャムファルマシア社製）等を用いた分配カラムクロマトグラフィーあるいはコスモシール140C18（登録商標、ナカライテスク社製）等を用いた逆層カラムクロマトグラフィーを用いて粗精製できる。またこのようにして粗精製されたF-15078は、更にショウデックスアサヒバックC8P50-4E（登録商標



、昭和電工（株）社製）、YMCバックODS-AM（登録商標、（株）ワイエムシイ社製）、カプセルバックUG120（登録商標、資生堂社製）等の逆層カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー等で精製することができる。

【0037】

以上の単離、精製の手段を単独または適宜組み合わせ、または反復して用いることによりF-15078を単離精製することができる。

本発明のF-15078またはその塩は抗真菌作用を有し、真菌感染症の予防薬または治療薬として有用である。

【0038】

本発明のF-15078またはその塩を真菌感染症の予防薬または治療薬として用いる場合、種々の形態で投与される。その投与形態としては特に限定はなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別その他の条件、疾患の程度等に応じて決定される。例えば錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、およびカプセル剤の場合には経口投与される。また注射剤の場合には、単独、もしくはブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液との混合、あるいはポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等と混和してエマルジョンとして静脈内投与され、さらには必要に応じて単独で筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与される。坐剤の場合には直腸内投与される。

【0039】

これらの各種製剤は、常法に従って主薬に賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、溶解剤、矯味矯臭剤、コーティング剤等既知の医薬製剤分野において通常使用しうる既知の補助剤を用いて製剤化することができる。

【0040】

錠剤の形態に成形するに際しては、担体としてこの分野で従来公知のものを広く使用でき、例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、澱粉、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、珪酸等の賦形剤、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、澱粉液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥澱粉、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン

末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、澱粉、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第四級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、澱粉等の保湿剤、澱粉、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状珪酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、硼酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等が例示できる。更に錠剤は必要に応じ通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸溶被錠、フィルムコーティング錠あるいは二重錠、多重錠とすることができる。

#### 【 0 0 4 1 】

丸剤の形態に成形するに際しては、担体としてこの分野で従来公知のものを広く使用でき、例えばブドウ糖、乳糖、澱粉、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルク等の賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン、エタノール等の結合剤、ラミナラン、カンテン等の崩壊剤が例示できる。

#### 【 0 0 4 2 】

坐剤の形態に成形するに際しては、担体としてこの分野で従来公知のものを広く使用でき、例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成グリセライド等を挙げることができる。

#### 【 0 0 4 3 】

注射剤として調製される場合には、液剤および懸濁剤は殺菌され、且つ血液と等張であるのが好ましく、これら液剤、乳剤および懸濁剤の形態に形成するに際しては、希釈剤としてこの分野において慣用されているものを全て使用でき、例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、エポキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を挙げることができる。尚、この場合、等張性の溶液を調製するに十分な量の食塩、ブドウ糖またはグリセリンを医薬製剤中に含有せしめてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤糖を添加してもよい。

#### 【 0 0 4 4 】

更に必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等や他の医薬品を含有せしめてもよい。

【 0 0 4 5 】

上記医薬製剤中に含まれる有効成分化合物の量は、特に限定されず広範囲に適宜選択されるが、通常全組成物中 1 - 7 0 重量%、好ましくは 1 - 3 0 重量%含まれる量とするのが適当である。

【 0 0 4 6 】

その投与量は症状、年齢、体重、投与方法および剤形等によって異なるが通常は成人に対して 1 日、上限として 2 0 0 0 m g（好ましくは 2 0 0 m g、更に好ましくは 2 0 m g）であり、下限として 0. 0 0 1 m g（好ましくは 0. 0 1 m g、更に好ましくは 0. 1 m g）を投与することができる。

【 0 0 4 7 】

【実施例】

次に、実施例をあげて本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1 F-15078

(1) 培養

ホーマ・エスピー SANK 13899株(受託番号 F E R M B P - 6 8 5 1)を、滅菌 (121℃、30分間) した後述の組成からなる前培養培地 100 m l を含む 500 m l 容三角フラスコ 3 本に一白金耳接種し、23℃で 210 r p m (7 c m の回転半径) のロータリー振とう培養機で 5 日間培養した。このようにして得られた培養液を、同じ組成の培地 400 m l を含む 2 L 容三角フラスコ 9 本に 5% 接種し、23℃で 210 r p m (7 c m の回転半径) のロータリー振とう培養機で 2 日間培養した。このようにして得られた種培養液を、滅菌 (121℃、30分間) した後述の組成からなる本培養培地 15 L を含む 30 L 容ジャー培養機 4 基に 5 % を植菌して、温度 23℃、通気量 1 v v m、回転数 100 ~ 420 r p m、溶存酸素量 5.0 p p m で 7 日間培養した。

【 0 0 4 8 】

【表 1】 前培養培地の培地組成

グリセリン	30 g
グルコース	30 g
可溶性澱粉	20 g
大豆粉	10 g
ゼラチン	2.5 g
イーストエキス (Difco)	2.5 g
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	2.5 g
消泡剤*	0.1 ml
水道水	1000 ml
(pH無調製)	

【0049】

【表 2】 本培養培地の培地組成

デキストリン (Difco)	10 g
グリセリン	20 g
グルコース	30 g
マルトエキス (Difco)	10 g
イーストエキス (Difco)	2 g
トリプトン (Difco)	1 g
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1 g
$\text{NaNO}_3$	1 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
消泡剤*	0.1 ml
水道水	1000 ml
(pH無調製)	

\* ニッサン・デイスフォームCB-442（登録商標、日本油脂（株）社製）

## （２）単離精製

得られた培養終了液60 Lにアセトン60 Lを加えて40分間攪拌し、この抽出液に濾過助剤（セライト545：セライトコーポレーション社製）を3 kg加え、フィルタープレス濾過を行なった。更に濾液に酢酸エチル50 Lを加えて抽出を行ない、得られた溶媒層49 Lを50 Lの飽和食塩水および50 Lの精製水で洗浄後、5 kgの無水硫酸ナトリウムを加えて1時間脱水した。フィルタープレス濾過により硫酸ナトリウムを除去した後、濾液を減圧濃縮乾固した（95.9 g油状物質）。濃縮物を、メタノールと0.04%トリフルオロ酢酸水を8：2の割合で混合した溶液100 mlに溶解して、同一溶媒で平衡化した22 LのトヨパールHW-40F（登録商標、トーソー（株）社製）カラムに供与した。カラムを同一溶媒で展開し、溶出液を500 ml毎に分画し、F-15078を主成分とする13番から25番までの画分（6.5 L）を得た。得られた画分を2 Lまで減圧濃縮した後、濃縮液を6.25規定の水酸化ナトリウムでpH 7に調整した。この濃縮液に酢酸エチル3.1 Lを加えて活性物質を抽出した。抽出液を3 Lの飽和食塩水にて洗浄し、無水硫酸ナトリウムによる脱水を行なった後、減圧濃縮乾固を行ない66.5gの油状物質を得た。この油状物質をメタノールと0.05%トリフルオロ酢酸水を8：2の割合で混合した溶液160 mlに溶解し、アセトニトリルと0.05%トリフルオロ酢酸水を4：6の割合で混合した溶液で平衡化した3 Lのコスモシール140C18（登録商標、ナカライテスク社製）に供与した。カラムを10 Lの同一溶媒で洗浄し、更にアセトニトリルと0.05%トリフルオロ酢酸水を6：4の割合で混合した溶液で展開した。溶出液を2 L 毎に分画したところ、F-15078を主成分とする2番目の画分を2 L得た。得られた画分を800 mlまで減圧濃縮した後、濃縮液を6.25規定の水酸化ナトリウムでpH 7に調整し、酢酸エチル1 Lを加えて活性物質を抽出し、洗浄、脱水、減圧濃縮乾固し、粗精製物を234.3 mg得た。この粗精製物を4 mlのメタノールに溶解した後、以下のような条件で高速液体クロマトグラフィーを行ない、F-15078を主成分とする画分が得られた。

高速液体クロマトグラフィーの条件：

カラム：YMCパックODS-AM 30x300 mm (株)ワイエムシー社製)

溶媒：アセトニトリル：1%トリエチルアミンリン酸水 (pH 6.0) = 75：25

検出波長：UV 210 nm

流速：10.4 ml/分

温度：室温

保持時間：77～98分

最終的に得られた画分を上述と同様にして酢酸エチルを用いて脱塩し、F-15078標品を34.1mg得た。

#### 試験例 1 F-15078の抗真菌作用

抗真菌活性（最小発育阻止濃度）は次の方法に従って測定した。即ち、0.165MのMOPSバッファー（3- [N-モルフォリノ] プロパンスルホン酸：シグマ社製）を含むRPMI 1640培地を用いて96穴マイクロタイタープレートによるブロス希釈法で測定した（J. Med. Mycol. 36, 61-86 (1995)参照）。

結果を以下の表3に示す。

【0050】

【表3】

#### F-15078の抗真菌活性

被検菌	最小発育阻止濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )
<i>Candida albicans</i>	TIMM3166 2.5
<i>Aspergillus fumigatus</i>	IAM2034 1.3
<i>Cryptococcus neoformans</i>	IAM4772 0.63

表 3 に示したように 3 種の真菌にいずれに対しても阻害効果を示した。

製剤例 1 経口用カプセル剤

【 0 0 5 1 】

【表 4】 処方

F-15078	3 0 m g
乳糖	1 7 0 m g
トウモロコシ澱粉	1 5 0 m g
<u>ステアリン酸マグネシウム</u>	<u>2 m g</u>
	3 5 2 m g

上記処方の粉末を混合し、30メッシュのふるいを通した後、この粉末をゼラチンカプセルに入れ、カプセル剤とする。

【 0 0 5 2 】

【発明の効果】

本発明の新規化合物F-15078またはその塩は抗真菌作用を示し、各種真菌感染症の予防または治療薬として有用である。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

各種真菌感染症の予防または治療薬として有用な新規化合物を提供する。

【解決手段】

ホーマ(Phoma)属に属するホーマ・エスピー(Phoma sp.)SANK 13899株(F E R M B P - 6 8 5 1)を培養し、その培養物より採取した各種真菌感染症の予防または治療薬として有用な新規化合物F-15078に関する。

【選択図】

なし。





特平 11-249959

## 認定 - 付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第249959号
受付番号	59900858501
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成11年 9月 7日

### <認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年 9月 3日
-------	-------------

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001856]

1. 変更年月日 1990年 8月15日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都中央区日本橋本町3丁目5番1号

氏 名 三共株式会社